

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 083 870

②① N° d'enregistrement national : **18 56506**

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/558 (2018.01), G 01 N 33/577**

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.07.18.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.01.20 Bulletin 20/03.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

☐ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE DE COOPERATION INTER-
NATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablis-
sement public — FR.

⑦② Inventeur(s) : CETRE-SOSSAH CATHERINE,
ALBINA EMMANUEL et CARDINALE ERIC.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE DE COOPERATION INTER-
NATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablis-
sement public.

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT (FVR).

⑤⑦ La présente invention concerne un dispositif de ban-
delette immunochromatographique, de préférence à écou-
lement latéral, pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné
à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un
antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift
(RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un
fragment antigénique de celle-ci, comprenant au moins :

(i) Une membrane comprenant une zone de capture ou
zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un anticorps de
capture spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la
fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigé-
nique de celle-ci, et une zone de contrôle (C) sur laquelle est
adsorbé un anticorps de contrôle, et

(ii) Un papier filtre comprenant une zone sur laquelle est
adsorbé un anticorps de révélation, spécifique de la nucléo-
protéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, cou-
plé à un système de révélation,

ledit filtre étant superposé et fixé par adhésion à ladite
membrane (i) de sorte à ce que les zones comprenant ledit
anticorps de révélation, ledit anticorps de capture et ledit an-
ticorps de contrôle soient distinctes.

FR 3 083 870 - A1



Test de diagnostic rapide de la fièvre de la vallée du Rift (FVR)

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne notamment un dispositif de bandelette
5 immunochromatographique pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV), ainsi qu'un procédé notamment destiné à la détection précoce d'une infection naturelle par ledit virus mettant en œuvre ledit dispositif.

10 ETAT DE LA TECHNIQUE

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) est décrit comme un virus émergent transmis par voie vectorielle, par plusieurs espèces de moustiques. Il touche un large éventail d'animaux domestiques et sauvages (petits ruminants, bovins, camélidés, buffles) et l'Homme, en Afrique et dans la péninsule arabique. Ce virus appartenant au genre
15 *Phlebovirus*, à la famille des Phenuiviridae et à l'ordre des Bunyavirales, est transmis par des moustiques appartenant au moins à 6 genres différents (Faburay et al., 2017). Identifié à l'origine dans la vallée du Grand Rift au Kenya en 1930 et initialement confiné au continent Africain, il s'est ensuite répandu à Madagascar, dans l'archipel des Comores et dans la péninsule arabique. On s'inquiète de plus en plus de son expansion. En effet, une grande
20 diversité d'espèces de moustiques le transmette, y compris des espèces distribuées dans des pays où la circulation de la FVR n'est pas encore connue mais où les facteurs environnementaux et climatiques présents sont en faveur de la circulation du virus RVFV (Brustolin et al., 2017).

La survenue récente de foyers de FVR dans plusieurs pays d'Afrique (Soudan,
25 Ouganda, Niger, Mali, Kenya et Rwanda) en 2017-2018 illustre l'actualité de l'émergence de la FVR. Les mouvements humains et animaux, incluant les mouvements ruraux dans des territoires notamment confrontés aux guerres civiles, ont probablement un rôle dans la propagation du RVFV et dans son extension potentielle en dehors de ses frontières traditionnelles vers l'Afrique du Nord et éventuellement vers l'Europe. Dans ce dernier cas,
30 l'introduction du RVFV pourrait provoquer de graves épidémies puisque les populations humaines ou animales sont encore immunologiquement naïves au regard de ce virus.

Le développement d'outils de diagnostic rapides capables de détecter l'infection par le virus RVFV est donc crucial aussi bien pour l'Homme que les animaux élevés et vivants en zones endémiques et/ou à risque pour la FVR.

A la connaissance de Demandeur, il n'existe pas d'outil de diagnostic de la FVR qui soit simple, peu coûteux et fiable pour faciliter des diagnostics de terrain rapides et précis, permettant notamment d'anticiper et d'alerter précocement les épidémies/épizooties et ainsi de mieux les gérer.

5

Le Demandeur a ainsi mis au point un dispositif de bandelette immunochromatographique à écoulement latéral sur la base de la détection de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV). Ses performances ont été évaluées à partir de sérums de terrain de statut connu et de souches isolées provenant de différents hôtes et origines géographiques sur une période de 69 ans, avec un accent particulier sur l'Afrique. Un très bon niveau de sensibilité et de spécificité illustré par l'absence de réactivité croisée avec d'autres virus appartenant au genre *Phlebovirus*, *Flavivirus*, *Orthobunyavirus*, *Alphavirus*, *Reovirus* a été observé.

Le dispositif de bandelette immunochromatographique selon l'invention représente donc un outil de diagnostic d'intérêt, rapide et sensible, qui peut être utilisé pour la détection d'une infection naturelle par le virus RVFV sur le terrain en conditions d'épidémie/épizootie. La disponibilité de ce test de diagnostic rapide (TDR) permet de fournir un soutien supplémentaire au jugement clinique médical en première instance et permet de réduire le temps nécessaire à la confirmation du test dans les cas secondaires de la maladie. Par conséquent, l'utilisation d'un test selon l'invention effectué sur le terrain, à proximité des foyers où se trouvent les populations humaines et animales infectées, permet d'obtenir un contrôle précoce et une gestion plus efficace des foyers incriminés et donc de limiter la propagation de la maladie.

Enfin et de façon avantageuse, ce test ne requiert aucune compétence professionnelle, ni aucun réactif ou équipement spécifique, permettant de fournir un test de première intention complémentaire intéressant pour les laboratoires de diagnostic dépourvus d'installations spécialisées. Dans le cas d'échantillons trouvés positifs, une confirmation par des tests alternatifs peut alors être envisagée avec un envoi de ces échantillons vers des laboratoires de référence nationaux et internationaux. La durée de conservation du test, dans un sachet en aluminium scellé contenant un dessicant, est d'au moins 12 mois à 4 ° C sans perte de sensibilité, ce qui présente un grand intérêt pour les régions éloignées et difficilement accessibles où ce test est applicable.

35

EXPOSE DE L'INVENTION

Un premier objet de l'invention est un dispositif de bandelette immunochromatographique, de préférence à écoulement latéral, pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un fragment antigénique de celle-ci, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins :

- (i) Une membrane comprenant une zone de capture ou zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, et une zone de contrôle (C) sur laquelle est adsorbé un anticorps de contrôle,
 - (ii) Un papier filtre comprenant une zone sur laquelle est adsorbé un anticorps de révélation, spécifique de la nucléoprotéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation, ledit filtre étant superposé et fixé par adhésion à ladite membrane (i) de sorte à ce que les zones comprenant ledit anticorps de révélation, ledit anticorps de capture et ledit anticorps de contrôle soient distinctes |
 - (iii) et éventuellement un cadre en plastique protecteur,
- ou alternativement
- (i') Une membrane comprenant successivement :
 - une première zone sur laquelle est adsorbée un anticorps de révélation, spécifique de la nucléoprotéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation,
 - une zone de capture ou zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un premier anticorps (anticorps de capture) spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigénique de celle-ci et
 - une zone de contrôle (C) sur laquelle est adsorbé un anticorps de contrôle,
 - (ii') et éventuellement un cadre en plastique protecteur.

L'invention porte également sur un kit pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un fragment antigénique de celui-ci, comprenant au moins :

- a) Un dispositif de bandelette immunochromatographique tel que défini selon l'invention, et
- b) Un tampon de migration de l'échantillon biologique dans le dispositif.

5 Un autre objet de l'invention concerne un procédé immunochromatographique ou test de diagnostic rapide (TDR) pour la détection, dans un échantillon biologique, d'au un moins antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou un fragment antigénique de celle-ci, mettant en œuvre un dispositif tel que défini selon l'invention, comprenant les étapes de :

- 10 (i) Mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou un fragment antigénique de celle-ci (antigène) avec un anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) et un anticorps de révélation spécifique de la nucléoprotéine (N), dans des conditions
- 15 permettant la formation d'un complexe anticorps de capture-antigène-anticorps de révélation, et
- (ii) Détection dudit complexe anticorps de capture-antigène-anticorps de révélation.

20 Le procédé immunochromatographique selon l'invention est notamment destiné à détecter le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) chez un animal infecté naturellement, et caractérisé en ce que l'échantillon biologique prélevé chez ledit animal est choisi dans le groupe constitué de sérum ou de plasma, en particulier provenant de prélèvements sanguins ou d'exsudats d'organes (foie, rate).

25

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du génome du virus RVFV, souche MP12 (Flick & Bouloy, 2005)

Figure 2 : Caractérisation des anticorps monoclonaux sélectionnés pour le test de diagnostic rapide de l'invention : Figure 2A (IFA, Immunofluorescence Assay) ; Figure 2B : Western Blot SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (13.5%) coloré au bleu de Coomassie. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire, puits 2 : contrôle IgG, puits 3 : anticorps purifié 8E10-4A4, puits 4 anticorps purifié 10H3-4E4-3D5.

Figure 3 : Test bandelette de diagnostic rapide pour la détection du virus FVR utilisant les deux anticorps monoclonaux sélectionnés.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention porte donc notamment sur un dispositif de bandelette immunochromatographique, de préférence à écoulement latéral, pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un fragment antigénique de celle-ci, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins :

- 10 (i) Une membrane comprenant une zone de capture ou zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, et une zone de contrôle (C) sur laquelle est adsorbé un anticorps de contrôle,
- 15 (ii) Un papier filtre comprenant une zone sur laquelle est adsorbé un anticorps de révélation, spécifique de la nucléoprotéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation, ledit filtre étant superposé et fixé par adhésion à ladite membrane (i) de sorte à ce que les zones comprenant ledit anticorps de révélation, ledit anticorps de capture et ledit anticorps de contrôle soient distinctes |
- 20 (iii) et éventuellement un cadre en plastique protecteur, ou alternativement
- (i') Une membrane comprenant successivement :
 - une première zone sur laquelle est adsorbée un anticorps de révélation, spécifique de la nucléoprotéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation,
 - 25 - une zone de capture ou zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un premier anticorps (anticorps de capture) spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigénique de celle-ci et
 - 30 - une zone de contrôle (C) sur laquelle est adsorbé un anticorps de contrôle,
 - (ii') et éventuellement un cadre en plastique protecteur.

Par 'détection', on entend une détection qualitative, c'est-à-dire la présence ou l'absence d'un antigène spécifique du RVFV dans l'échantillon biologique testé.

Par 'échantillon biologique', on entend notamment un échantillon sanguin (sérum, plasma) susceptible de contenir des antigènes spécifiques du virus de la fièvre de la vallée du Rift, et en particulier la nucléoprotéine (N) ou un fragment antigénique de celle-ci.

5 Selon un mode particulier, ledit échantillon biologique est choisi parmi un échantillon de sérum ou de plasma provenant d'un prélèvement sanguin ou des exsudats d'organes infectés (foie, rate) notamment de plasma. Selon un mode particulier de l'invention, on utilisera un échantillon de sérum ou de plasma.

10 En particulier, ledit échantillon biologique est un échantillon prélevé à partir de toute espèce animale mammifère sensible au virus RVFV, telle que notamment de bovins, buffles, ovins, caprins, ou camélidés.

Selon un mode particulier, l'échantillon biologique sera un échantillon biologique d'un animal susceptible d'avoir été infecté depuis au moins 12 heures, ou en particulier dans une fenêtre de temps pouvant aller de 12 heures à 6 jours.

15

DISPOSITIF DE BANDELETTE IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUE

Test bandelette

20 Le test de bandelette immunochromatographique selon l'invention peut être un test à écoulement latéral, c'est-à-dire incluant une migration latérale de l'échantillon biologique (fluide) par capillarité. Selon un autre mode de réalisation, la migration du fluide par capillarité peut se faire en vertical, par exemple lorsque la bandelette est immergée en son extrémité dans l'échantillon biologique à tester.

25 Les tests d'écoulement latéral (Lateral Flow Test, LFT), tests bandelettes immunochromatographiques ou tests de diagnostic rapide (TDR) sont des outils de détection rapide, la détection pouvant aller généralement de quelques minutes à 1 heure (généralement 15 minutes), à usage unique, capables de détecter la présence d'un analyte dans un échantillon liquide, le long d'une bande membranaire placée dans un dispositif plastique protecteur.

30 Le résultat peut être facilement visualisé à l'œil nu (ligne de test 'T' et ligne de contrôle 'C'), comme illustré à la Figure 3. On parlera dans le reste de la description indifféremment de test de diagnostic rapide ou de test d'écoulement latéral ou de test bandelette immunochromatographique.

35

Antigène spécifique du virus RVFV

Le virus de la FVR est un virus à ARN linéaire simple brin enveloppé de forme sphérique d'un diamètre de 80-110 nm. Comme tous les *Bunyavirus*, le RVFV est composé d'un génome à ARN tri-segmenté, qui se compose d'un grand segment (L, Large) qui code pour la polymérase, d'un segment moyen (M, Medium), qui code pour les deux glycoprotéines G_c et G_N et une protéine non structurale NSm et d'un petit segment (S, Small) qui code pour la nucléoprotéine N et une protéine non structurale NSs (Flick & Bouloy, 2005).

Par 'antigène' spécifique du RVFV selon l'invention, on entend la nucléoprotéine (N) synthétique ou recombinante dudit virus ou un fragment peptidique antigénique de celle-ci.

Les fragments antigéniques de la nucléoprotéine (N) dudit virus FVR peuvent être détectés à la place de la nucléoprotéine (N), à condition que lesdits fragments soient capables de se lier à des anticorps spécifiques de la nucléoprotéine (N).

L'homme du métier, sur la base de ses connaissances et des méthodes à disposition, pourra ainsi, en exprimant des parties de la séquence ou en réalisant une cartographie des épitopes (epitope mapping) par synthèse de peptides chevauchants, définir des fragments antigéniques utilisables selon l'invention pour produire les anticorps spécifiques correspondants.

Selon un mode particulier, l'antigène spécifique de la nucléoprotéine N comprend une séquence SEQ ID NO : 1 en nucléotides (735 paires de bases) (numéro d'accès Genbank AF134534.1) ou une séquence SEQ ID NO : 2 en acides aminés (245 acides aminés) (numéro d'accès Genbank AF00698.1) de la nucléoprotéine (N).

De même que lesdites protéines, les fragments antigéniques peuvent être d'origine synthétique ou recombinante.

Selon un mode particulier de l'invention, l'antigène cible selon la présente invention comprend au moins une séquence en acides aminés présentant au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité avec la SEQ ID N°2 de la nucléoprotéine (N) dudit virus de la FVR.

Le pourcentage d'identité entre deux séquences a une signification reconnue dans l'état de l'art ; il est déterminé sur la base d'un alignement global des séquences à comparer, c'est-à-dire sur un alignement des séquences prises dans leur intégralité sur toute la longueur en utilisant tout algorithme bien connu de l'homme du métier tel que l'algorithme de Needleman et Wunsch-1970 ; et l'homme du métier utilisera les méthodes connues de comparaison et d'alignement, par exemple les algorithmes de comparaison de séquences, pour mesurer

l'identité entre deux séquences polypeptidiques. On peut citer à titre d'exemple les algorithmes BLAST disponibles sur les sites NCBI et Uniprot.

Anticorps anti-RVSV et anticorps de contrôle

5 Le terme "anticorps" selon l'invention comprend des anticorps entiers et tout fragment de liaison à un antigène ou une chaîne unique de celui-ci. Ainsi, le terme "anticorps" comprend toute molécule contenant une protéine ou un peptide qui comprend au moins une partie d'une molécule d'immunoglobuline. Ainsi le terme anticorps comprend également les immunoglobulines de tout isotype, les fragments d'anticorps qui retiennent la liaison
10 spécifique à l'antigène, y compris Fab, Fab', F(ab)2.

Les anticorps peuvent être polyclonaux, monoclonaux, multi-spécifiques (par exemple, des anticorps bispécifiques) ou des fragments d'anticorps, du moment qu'ils présentent l'activité biologique souhaitée. Les anticorps peuvent être isolés de n'importe quelle source biologique appropriée, par exemple, souris, rat, lapin, etc...

15 Le terme "anticorps monoclonal" se réfère à un anticorps obtenu à partir d'une population d'anticorps sensiblement homogène. Les anticorps monoclonaux sont hautement spécifiques, car chaque anticorps monoclonal est dirigé contre un seul déterminant de l'antigène. Les anticorps peuvent être marqués de manière détectable, par exemple, avec un radio-isotope, une enzyme qui génère un produit détectable, une protéine fluorescente, etc...

20 Les anticorps peuvent être en outre conjugués, avec par exemple de la biotine (impliquée dans la liaison spécifique biotine-avidine). Les anticorps peuvent également être liés à un support solide, y compris, mais sans s'y limiter, à des plaques ou des billes de polystyrène, et analogues. Dans le cadre de la présente invention, ils seront liés à un support solide tel qu'une membrane de nitrocellulose ou un filtre. Des anticorps monoclonaux peuvent être

25 générés en utilisant des techniques d'hybridome ou des procédés de recombinaison d'ADN connus dans l'art. Un hybridome est une cellule produite en laboratoire à partir de la fusion d'un lymphocyte producteur d'anticorps et d'une cellule cancérigène produisant un anticorps, généralement un myélome ou un lymphome. Un hybridome prolifère et produit un apport continu d'un anticorps monoclonal spécifique. Des techniques alternatives pour générer ou

30 sélectionner des anticorps comprennent l'exposition *in vitro* de lymphocytes à des antigènes d'intérêt, et le criblage de banques d'affichage d'anticorps dans des cellules, des phages ou des systèmes similaires.

Le terme "anticorps polyclonal" se rapporte à une préparation d'anticorps qui sont dérivés de lignées de lymphocytes B différentes. Ils sont un mélange de molécules

d'immunoglobulines sécrétées contre un antigène spécifique, chacune reconnaissant un épitope différent.

Selon un mode particulier et préféré de l'invention, on utilisera des anticorps monoclonaux.

5 Ils sont produits selon les méthodes connues de l'homme du métier. Selon un mode particulier, des particules virales dites VLPs (Virus Like Particles) produites par le système d'expression baculovirus basé sur la construction plasmidique pΔPhC3T –N (Agate Bioservices, Bagard, France) exprimant la protéine N ont été purifiées selon Liu et al. 2008. Elles ont ensuite été administrées à des souris Balb/c (Biotem, Le Rivier d'Apprieu, France),
10 permettant la fusion et la production d'anticorps monoclonaux (Mab, Monoclonal antibody) spécifiques de la protéine N du RVFV.

Anticorps de capture

L'anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (SEQ ID NO : 2) ou d'un fragment antigénique de celle-ci est adsorbé sur la
15 membrane du dispositif de l'invention, au niveau d'une zone de capture ou zone de test (T).

Selon un mode particulier, l'anticorps de capture est un anticorps monoclonal spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (SEQ ID NO : 2).

Selon un mode particulier, l'anticorps de capture est un anticorps produit chez la souris purifié à partir d'ascite (chromatographie d'affinité sur protéine A ceramic hyper DF), d'isotype
20 IgG2a, désigné 10H3-4E4-3D5.

Il est conditionné dans un tampon phosphate 10mM-NaCl 0,15M- pH7,4- sans agent conservateur, et conservé aliquoté à une température inférieure ou égale à -20°C.

Sur gel de polyacrylamide SDS PAGE 13,5% en conditions dénaturantes et coloré au bleu de
25 Coomassie, il présente une bande à 50kDa et une bande entre 25 et 30kDa, conformément au profil d'un contrôle IgG.

L'homme du métier saura déterminer la quantité d'anticorps de capture à adsorber sur ladite membrane de nitrocellulose.

30 Anticorps conjugué (autrement nommé anticorps de révélation)

L'anticorps de révélation spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (SEQ ID NO : 2) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation, est adsorbé sur un papier filtre destiné à être superposé et fixé par
adhésion à ladite membrane du dispositif, de sorte à ce que les zones comprenant ledit
35 anticorps de révélation, ledit anticorps de capture et ledit anticorps de contrôle soient

distinctes. Selon un autre mode, l'anticorps de révélation est adsorbé sur la membrane du dispositif sur une zone la plus proche de la zone de dépôt (S) de l'échantillon, en amont des zones de test (T) et de contrôle (C).

5 Selon un mode particulier, l'anticorps de révélation est un anticorps monoclonal spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (SEQ ID NO : 2) couplé à un système de révélation. Le système de révélation peut être choisi dans le groupe constitué de : peroxydase, phosphatase alcaline, fluorophore, marqueur chemo-luminescent ou radioactif, particules d'or colloïdal, latex simple ou coloré.

10 Selon un mode particulier et préféré, l'anticorps de révélation est couplé à des particules d'or colloïdal.

Selon un mode particulier, l'anticorps de révélation est un anticorps produit chez la souris purifié à partir d'ascite (chromatographie d'affinité sur protéine A ceramic hyper DF), d'isotype IgG1, désigné 8E10-4A4.

15 Il est conditionné dans un tampon phosphate 10mM-NaCl 0,15M- pH7,4- sans agent conservateur, et conservé aliquoté à une température inférieure ou égale à -20°C.

Sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 13,5% en conditions dénaturantes et coloré au bleu de Coomassie, il présente une bande à 50kDa et une bande entre 25 et 30kDa, conformément au profil d'un contrôle IgG.

20 L'homme du métier saura déterminer la quantité d'anticorps de révélation à adsorber sur le papier filtre ou, selon un autre mode de réalisation, sur ladite membrane de nitrocellulose.

Anticorps de contrôle

Un anticorps de contrôle est adsorbé sur une zone de contrôle (C) de la membrane du dispositif de l'invention.

25 Selon un mode particulier, l'anticorps de contrôle est un anticorps de lapin anti-souris capable de reconnaître et se lier à l'anticorps de révélation sus-décrit.

L'homme du métier saura déterminer la quantité d'anticorps de contrôle à adsorber ladite membrane de nitrocellulose.

30 Membrane

Selon un mode particulier et préféré, la membrane du dispositif est une membrane de nitrocellulose. On peut mentionner notamment la membrane de nitrocellulose High Flow Membrane de Millipore, USA.

35

Filtre

Le filtre du dispositif est généralement un papier filtre de type papier Whatman.

- Le filtre est superposé et fixé par adhésion à la membrane, en particulier de sorte à ce que les zones comprenant ledit anticorps de révélation, ledit anticorps de capture et ledit anticorps de contrôle soient distinctes. Par 'zones distinctes', on entend que les zones sont
5 visibles individuellement sur la bandelette, et ne forment pas une seule et même zone, pour assurer une lisibilité correcte des résultats.

Perfectionnements du dispositif

- 10 Selon un autre mode de l'invention, et pour améliorer encore le seuil de détection d'au moins un antigène spécifique de la FVR, on peut utiliser en outre un anticorps secondaire (de type anticorps de révélation) capable de reconnaître et se lier au premier anticorps de révélation (anticorps primaire). Cet anticorps secondaire serait lui-même couplé à un système de révélation parmi ceux décrits ci-dessus.
- 15 On peut également optimiser le dispositif de l'invention en jouant sur les paramètres suivants : nature des tampons, et/ou nature de la membrane.

- Selon un mode particulier de l'invention, le dispositif de bandelette immunochromatographique est sous une forme lyophilisée et de préférence conditionnée
20 dans un emballage stérile et étanche, en particulier un sachet en aluminium scellé.

KIT

- L'invention porte également sur un kit pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la
25 fièvre de la vallée du Rift (RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un fragment antigénique de celui-ci, comprenant au moins :

- a) Un dispositif de bandelette immunochromatographique tel que défini ci-dessus, et
- b) Un tampon de migration de l'échantillon biologique dans le dispositif.

- Par 'tampon de migration', on entend un tampon permettant de faciliter la migration de
30 l'échantillon biologique dans le dispositif selon l'invention.

Le tampon de migration peut notamment comprendre différents solvants et sels adaptés pour la migration de l'échantillon biologique, en particulier d'un échantillon biologique de type sérum ou plasma. De préférence, on utilisera un volume de tampon de migration égal au volume de l'échantillon biologique (mélange volume à volume).

PROCEDE IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUE

L'invention porte également sur un procédé immunochromatographique ou test de diagnostic rapide (TDR) pour la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou un fragment antigénique de celle-ci, mettant en œuvre un dispositif tel que défini ci-dessus, comprenant les étapes de :

- (i) Mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou un fragment antigénique de celle-ci (antigène) avec un anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) et un anticorps de révélation spécifique de la nucléoprotéine (N), dans des conditions permettant la formation d'un complexe anticorps de capture-antigène-anticorps de révélation, et
- (ii) Détection dudit complexe anticorps de capture-antigène-anticorps de révélation.

Selon un mode particulier :

- un volume de l'échantillon biologique mélangé au tampon de migration, de préférence volume à volume, est déposé sur la zone (S) réservée à l'échantillon, entraînant la réhydratation des anticorps de révélation et leur migration par capillarité le long de la membrane ;
- si l'antigène est présent dans l'échantillon testé, le complexe antigène -anticorps de révélation est capturé par l'anticorps de capture immobilisé sur la membrane au niveau de la zone de test (T) formant un complexe anticorps de révélation-antigène-antigène, visualisé sous la forme d'une ligne, de préférence rouge, au niveau de la zone de test (T), révélant un résultat positif ;
- le système de révélation, en particulier les particules d'or, en excès (ou non), a continué à migrer le long du dispositif jusqu'à être capturé par l'anticorps de contrôle immobilisé au niveau de la zone de contrôle (C) formant une ligne, de préférence rouge, au niveau de la zone de contrôle (C) validant le test.

Le procédé immunochromatographique selon l'invention est destiné en particulier à détecter le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) chez un animal infecté naturellement.

Selon un mode particulier, l'échantillon biologique prélevé chez ledit animal est choisi dans le groupe constitué de sérum et de plasma, en particulier provenant de prélèvements sanguins ou d'exsudats d'organes (foie, rate).

5

L'invention va désormais être illustrée dans les exemples non-limitatifs suivants.

EXEMPLES

10 Le développement du test selon l'invention a reposé sur 2 étapes

- (i) la production de VLPs contenant la protéine N reconnue comme antigène immuno-dominant dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus de la FVR ;
 - (ii) la production de 2 anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine N, les uns non marqués fixés sur la membrane, les autres marqués à l'or colloïdal permettant
- 15 la révélation des antigènes présents dans l'échantillon à tester

Exemple 1 : Préparation de l'antigène spécifique de la FVR

Les gènes codant pour la nucléoprotéine N (SEQ ID N°1) et les glycoprotéines G_N/G_C (SEQ ID N°3) de la souche RVF ZH 548 isolée d'un prélèvement humain lors de l'épidémie de

20 RVF de 1977 en Egypte (El-Akkad et al., 1978) ont été sous-clonés respectivement dans le plasmide pΔPhC3T, sous le contrôle d'un promoteur polyhédrine (Agate Bioservices, Bagard, France) et dans le plasmide pTenTwinΔPATK sous le contrôle du promoteur p10 (Agate Bioservices, Bagard, France).

La protéine nucléocapsidique N ou nucléoprotéine N est une protéine immunogène

25 protectrice clé connue pour induire une très bonne réponse immunitaire. Les anticorps dirigés contre la nucléoprotéine N sont facilement détectés de façon précoce après l'infection et chez les hôtes infectés en convalescence, fournissant alors une base solide pour la détection diagnostique de la maladie.

30 Exemple 2 : Préparation et sélection des anticorps monoclonaux spécifiques de la nucléoprotéine N permettant le développement du test de diagnostic rapide FVR

Dans cette étude, des anticorps monoclonaux spécifiques du virus de la FVR dirigés contre la nucléoprotéine N ont été conjugués avec de l'or colloïdal (anticorps de révélation) pour lier les antigènes de FVR capturés par la membrane immobilisée (anticorps de capture),

35 et former une ligne rouge, témoignant de la présence d'antigènes de FVR dans l'échantillon

testé. Les performances du dispositif selon l'invention développé pour la mise en évidence d'une infection par le virus de la FVR ont été évaluées à partir d'une collection de souches virales de RVFV connues provenant de différentes épizooties/ épidémies et de sérums négatifs connus également provenant de différents territoires à risque pour la FVR ou ayant déjà connu des épidémies/ épizooties de FVR (Afrique : Mauritanie, Tunisie, et Océan Indien : Madagascar, Mayotte, Réunion, Union des Comores).

2.1 Production et sélection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes du virus de la FVR

Des particules virales (VLP, Virus Like Particles) exprimées par le système d'expression baculovirus basé sur la construction plasmidique pΔPhC3T -N et pTenTwinΔPATK-G_N/G_C (Agate Bioservices, Bagard, France) exprimant respectivement les protéines N et G_N/G_C ont été produites et purifiées selon Liu et al. 2008.

Elles ont ensuite été administrées à 5 souris Balb/c (Biotem, Le Rivier d'Apprieu, France), permettant la fusion et la production d'anticorps monoclonaux (Mab) spécifiques des protéines N ou GN / GC du virus RVFV

2.3 Sélection des anticorps monoclonaux pour une utilisation dans le test de diagnostic rapide

L'évaluation de la réactivité et de la spécificité desdits anticorps monoclonaux contre les antigènes de FVR a été testée selon deux méthodes en parallèle :

- (i) un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) basé sur les VLP à une concentration de 1 µg / ml, et un anticorps de révélation IgG / IgM anti-souris de chèvre conjugué à la peroxydase (1: 10000, Jackson Immunoresearch, USA), et
- (ii) un test d'immunofluorescence (IFA, Immunofluorescence Assay) basé sur des cellules eucaryotes de type Vero infectées avec la souche de FVR Smithburn (Boshra et al. 2011) (Genbank numéro d'accès DQ380157 (segment S), DQ 380193 (segment M), DQ375430 (segment L)) à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,25 pfu (particles forming units) par cellule avec un anticorps anti-souris marqué FITC (1: 1000) (Dako, France) comme anticorps de révélation.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 1 suivant :

Identification	ELISA- VLPs (DO) *	IFA **	Isotypage
----------------	--------------------	--------	-----------

de l'anticorps					
6A7	0,25	-	GN/GC	++	IgM
6E3	0,1	-	GN/GC	++	IgG3, IgM
7H7	0,9	-	GN/GC/N	+++	IgG1
8E10	2,9	+	N	+++	IgG1
10F6	2,8	+	N	+++	IgG2a, IgG3, IgG1, IgM
10H3	2,8	+	N	+++	IgG2a
12G6	2,7	+	N	+++	IgG1
15G6	2,8	+	N	+++	IgG2b
6E8	0.16	-	GN/GC	+++	IgG3

Tableau 1 : Résultats IFA et ELISA VLPs ayant permis la sélection des anticorps monoclonaux.

* Résultats exprimés en Densité Optique, une valeur supérieure à 1 est considérée comme positive.

**IFA, ++ correspond à un signal positif, +++ à un signal très positif ; Figure 2A

5 L'anticorps 8E10-4A4 est un anticorps de souris purifié à partir d'ascite (chromatographie d'affinité sur protéine A ceramic hyper DF, Sigma, France), d'isotype IgG1.

Il est conditionné dans un tampon phosphate 10mM-NaCl 0,15M- pH7,4- sans agent conservateur, et conservé aliquoté à une température inférieure ou égale à -20°C.

10 Sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 13,5% en conditions dénaturantes et coloré au bleu de Coomassie, il présente une bande à 50kDa et une bande entre 25 et 30kDa, conformément au profil d'un anticorps contrôle de classe IgG (Figure 2B).

L'anticorps 10H3-4E4-3D5 est un anticorps de souris purifié à partir d'ascite (chromatographie d'affinité sur protéine A ceramic hyper DF, Sigma France), d'isotype IgG2a.

15 Il est conditionné dans un tampon phosphate 10mM-NaCl 0,15M- pH7,4- sans agent conservateur, et conservé aliquoté à une température inférieure ou égale à -20°C.

Sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 13,5% en conditions dénaturantes et coloré au bleu de Coomassie, il présente une bande à 50kDa et une bande entre 25 et 30kDa, conformément au profil d'un anticorps contrôle de classe IgG (Figure 2B).

20 Les résultats ELISA sont présentés dans le Tableau 2 suivant, en valeur de densité optique (DO), une valeur supérieure à 1 est considérée comme positive, le bruit de fond (background et Sf9) doit être inférieur à une valeur de 0.3, le contrôle positif doit avoir une valeur supérieur à 1.

Tableau 2

Identification de l'hybridome	ELISA VLPs	ELISA G _N /G _C	ELISA N	Sf9
	Dilution 1 :10	Dilution 1 :10	Dilution 1 :10	Dilution 1 :10
10H3-4E4-3D5	1.455	0.154	1.371	0.184
Bruit de fond	0.054	0.123	0.162	0.226
Contrôle positif	2.156	2.6	2.844	2.557
8E10-4A4	0.447	0.288	0.928	0.261
Bruit de fond	0.077	0.36	0.166	0.209
Contrôle positif	1.552	3.100	2.207	2.924

L'ensemble de ces tests ELISA et IFA ont permis de confirmer que l'anticorps monoclonal 10H3-4E4-3D5, d'isotype IgG2a et l'anticorps monoclonal 8E10-4A4, de type IgG1 étaient dirigés contre la protéine N et sont les plus adaptés à une utilisation dans le dispositif de bandelette immunochromatographique selon l'invention.

2.2 Préparation des anticorps conjugués (anticorps de révélation)

L'anticorps monoclonal 8E10-4A4 d'isotype IgG1 est couplé à 40 nm de particules d'or colloïdal (Ferris et al., 2009) et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

Exemple 3. Production d'hybridomes et caractérisation des anticorps monoclonaux

Après fusion de splénocytes provenant d'une souris immunisée avec des particules virales de type VLPs purifiées exprimant les protéines N et G_N/G_C du virus FVR avec des cellules de la lignée de myélome murin SP2/0-AG14 (ATCC CRL-1581), sept lignées d'hybridomes présentant une forte réactivité contre la protéine N du virus FVR et appartenant aux IgG de sous-classe IgG1 ou IgG2a ont été clonées (3 cycles) et sélectionnées et étudiées pour leur pertinence pour la détection de l'antigène du virus de la FVR dans un test de diagnostic à écoulement latéral (FLT) selon l'invention.

Sur la base d'essais préliminaires réalisés avec des tests prototypes, les deux anticorps monoclonaux purifiés, l'anticorps 10H3-4E4-3D5 en tant qu'anticorps pour la fixation sur la

membrane de nitrocellulose (anticorps de capture) et l'anticorps Mab 8E10-4A4 en tant qu'anticorps conjugué (anticorps de révélation), ont été choisis pour être incorporés dans un dispositif pour d'autres validations de sensibilité et de spécificité. Les tests de dépistage (ELISA et IFA) ont donné les résultats attendus dans les deux cas (Tableau 1 et 2, Figure 1 et Figure 2A).

Exemple 4 : Préparation du test de diagnostic rapide FVR

L'assemblage du TDR selon l'invention s'est fait à partir d'un premier anticorps monoclonal fixé à la membrane (anticorps de capture) et un second anticorps monoclonal couplé à des particules d'or (anticorps de révélation). Un volume de 150 microlitres de sérum prélevé chez l'animal sera déposé sur la partie 'S' réservée à l'échantillon du TDR (S pour Sample), l'ajout de trois gouttes de tampon de migration (150 microlitres) sur l'échantillon est réalisé, la lecture se fait dans un délai de 30 minutes. Une ligne contrôle notée C doit apparaître sur chaque test réalisé et permet de le valider. Si une bande apparaît au niveau de la zone de test T, l'échantillon est considéré comme positif (contient un antigène spécifique du virus de la FVR), si aucune bande n'apparaît au niveau de la zone T, mais qu'une bande apparaît au niveau de la zone C, l'échantillon est considéré comme négatif ne contenant pas d'antigène de FVR.

4.1 Adsorption de l'anticorps monoclonal 10H3-4E4-3D5 (anticorps de capture) sur une membrane de nitrocellulose

L'anticorps monoclonal 10H3-4E4-3D5 d'isotype IgG2a, en solution dans un tampon phosphate (10 mM, NaCl 0.15 M, pH7.4) à une concentration finale de 2.2 mg/ml est appliqué sur une membrane de nitrocellulose (Hi-flow membrane, Millipore, USA) en utilisant l'équipement Bio-Dot air-brush (Bio-Dot, UK).

Un volume de 50µl de la solution d'anticorps est déposé par 30cm de membrane. Les anticorps de lapin anti-souris (Dako, Denmark) sont déposés à une concentration de 2.2 mg/ml au niveau de la zone contrôle (C) et en parallèle au niveau de la zone de test (T) contenant les anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre la protéine N du virus RVFV. Les membranes sont séchées à 37°C pour 45 min et stockées dans des sachets d'aluminium scellés jusqu'à utilisation à 4°C.

4.2 Adsorption de l'anticorps monoclonal couplé aux particules d'or identifié 8E10-4A4 (anticorps de révélation) sur papier filtre (bandelette)

L'anticorps couplé aux particules d'or 8E10-4A4 (anticorps de révélation), d'isotype IgG1, est appliqué sur papier filtre (Whatman, UK) en utilisant l'équipement Bio Dot air brush (Bio Dot, UK) à un volume de 1 µl/mm de papier filtre. Les papiers filtres (bandelettes) sont ensuite séchés.

5

4.3 Mise en œuvre du test TDR selon l'invention

Le papier filtre (bandelette) est appliqué au-dessus de la membrane de nitrocellulose qu'il recouvre, parallèlement au témoin, et les bandelettes d'anticorps de révélation sont collées à la membrane grâce à un adhésif découpé en bandes de largeur de 0,8 cm. Les bandelettes et les membranes ont été assemblées dans un dispositif tel que décrit précédemment (Brüning et al., 1999) de sorte que le papier filtre (bandelette) soit situé au-dessus de la membrane de nitrocellulose.

Différents surnageants viraux ou sérums provenant d'animaux domestiques ou sauvages de statut connu (volume de 150 µl) ont été mélangés avec un volume égal de tampon de migration (150 µl) et déposés sur ce test à écoulement latéral (LFT, Lateral Flow Test). Ceci entraîne la réhydratation des anticorps monoclonaux (Mab) conjugués aux particules d'or (anticorps de révélation) et leur migration par capillarité sur toute la longueur de la membrane.

Si l'antigène spécifique du virus de la FVR est présent dans l'échantillon testé, ceci signifie que le complexe antigène FVR-anticorps-couplé aux particules d'or (anticorps de révélation) est capturé par l'anticorps monoclonal immobilisé sur la membrane (anticorps de capture) au niveau de la zone ou ligne «T» (test). Ceci entraîne leur reconnaissance et attachement, visualisable sous la forme d'une ligne rouge correspondant donc à un résultat positif. Les particules d'or en excès (ou non) continuent leur migration tout au long du dispositif jusqu'à ce qu'elles soient capturées par l'anticorps de lapin anti-souris immobilisé (anticorps de contrôle), conduisant à la formation d'une ligne rouge au niveau de la zone ou ligne contrôle (C) permettant de valider le test.

Les zones de test (T) et de contrôle (C) sont observées pour leur développement de couleur au bout de 15 et 30 minutes suite à l'ajout de l'échantillon. Les résultats rendus sont soit positifs soit négatifs.

Une représentation schématique de la visualisation des résultats négatif et positif est illustrée en **Figure 3**.

4.4 Validation du test : Evaluation de la sensibilité et de la spécificité diagnostique

35

L'échantillon (sérum ou suspension virale, volume de 150µl) (contrôle positif) est mélangé avec 150 µl de tampon de migration et est appliqué au niveau de la zone 'S' (S, Sample) réservée à l'échantillon. Le test est valide lorsqu'une bande/ligne rouge est visible au niveau de la zone contrôle 'C'. Le test est positif lorsqu'une bande rouge est visible au niveau de la zone 'T' (test) et négatif lorsqu'aucune bande rouge n'est visible au niveau de la zone 'T' (test).

4.4.1 Sensibilité

L'analyse de la sensibilité du LFT s'est faite grâce à différents échantillons (souches virales de FVR référencées, souches virales autres que RVF mais appartenant à la famille des Bunyavirales, autres virus provoquant des signes cliniques proches de ceux de la FVR, échantillons de terrain provenant d'animaux atteints en phase aiguë de la maladie).

Bien que le virus de la FVR soit considéré comme ayant un seul génotype et sérotype, la sensibilité diagnostique, c'est-à-dire la proportion d'échantillons d'animaux de référence infectés testés positifs, a été évaluée avec 25 isolats viraux de FVR provenant de différentes origines géographiques (n = 25, **tableau 3**). La limite de détection (c'est-à-dire la plus petite quantité détectable d'antigène) a été évaluée en utilisant des dilutions sérielles de raison 10 de six isolats viraux différents (n = 6, **tableau 4**). Les échantillons ont été considérés comme de vrais positifs lorsqu'ils ont été trouvés positifs dans un test de RT-PCR basé sur la technique de Bird et al. 2007, considéré comme la technique de référence dans cette étude.

Les résultats correspondant à la sensibilité diagnostique du test LFT (Dse, Diagnostic Sensitivity) sont présentés dans le **tableau 3A**. Vingt-cinq souches de FVR isolées provenant de différentes origines géographiques détectées positives au virus de FVR selon la technologie Taqman real time RT-PCR (technique de référence actuelle pour la détection du virus de la FVR (Bird et al., 2007)) ont été détectées positives par le test de diagnostic rapide LFT de l'invention (Tableau 3) avec une sensibilité diagnostique du test (DSe) de 100% (n=25).

Tableau 3 : Origine des échantillons utilisés pour évaluer la sensibilité et la spécificité du test TDR (LFT) selon l'invention: Identification, année d'isolement, origine des souches virales ou échantillons de sérums testés dans cette étude.

A. Sensibilité et détectabilité					
Genre	Souche /	Année	Pays d'origine	La source	Résultat

	Esèces	d'isolement			LFT
Phlebovirus	Souche de RVFV Smithburn *	1944	Ouganda	moustique	Positif
Phlebovirus	La souche de RVFV Lunyo	1955	Ouganda	moustique	Positif
Phlebovirus	Souche RVFV AN 1830 *	1956	Afrique du Sud	mouton	Positif
Phlebovirus	Souche RVFV KEN56 / B2653 / IB8	1963	Kenya	bovin	Positif
Phlebovirus	VFVR souche 56/74 (WYJIUOWO) *	1974	Afrique du Sud	vache	Positif
Phlebovirus	RVFV souche 252/75 *	1975	Afrique du Sud	N / A	Positif
Phlebovirus	RVFV souche ZH501	1977	Egypte	Humain	Positif
Phlebovirus	VFRV souche VRL688 / 78	1978	Zimbabwe	bovin	Positif
Phlebovirus	Souche RVFV AR 20368 *	1981	Afrique du Sud	moustique	Positif
Phlebovirus	RVFV ARD 38388	1983	Burkina Faso	moustique	Positif
Phlebovirus	RVFV ArD38661	1983	Sénégal	moustique	Positif
Phlebovirus	RVFV 143/83	1983	Namibie	Humain	Positif
Phlebovirus	RVFV ANK 6087	1984	Guinée	Chauve- souris	Positif
Phlebovirus	RVFV SPU45 / 85	1985	Zambie	Humain	Positif
Phlebovirus	RVFV SPU204 / 855	1985	Angola	Humain	Positif

Phlebovirus	RVFV An991	1991	Madagascar	bovin	Positif
Phlebovirus	RVFV Tambul	1994	Egypte	ovin	Positif
Phlebovirus	RVFV SPU12 / 98/2	1998	Somalie	chèvre	Positif
Phlebovirus	RVFV souche AR21229	2000	Arabie Saoudite	moustique	Positif
Phlebovirus	RVFV F057	2007	Kenya	Humain	Positif
Phlebovirus	RVFV-HA09-001	2008	Madagascar	bovin	Positif
Phlebovirus	AL51	2009	Madagascar	Moustique	Positif
Phlebovirus	VFFV souche 26010 YK0 *	2010	Mauritanie	chameau	Positif
Phlebovirus	VFFV souche isolat de champ 2687	2013	Mauritanie	chèvre	Positif
Phlebovirus	VFFV souche isolat de champ 2	2013	Sénégal	chèvre	Positif

B. Spécificité					
Phlebovirus	Virus Arumowot	ND	ND	ND	Négatif
Phlebovirus	Virus de la forêt de Gabek	ND	ND	ND	bande faible
Phlebovirus	Virus Saint Floris	ND	ND	ND	Négatif
Flavivirus	Virus du Nil occidental	ND	Madagascar	ND	Négatif
Flavivirus	Virus de la dengue, sérotype 2	ND	La Réunion, France	Humain	Négatif
Orthobunyavirus	Virus Akabane	ND	ND	ND	Négatif
Orthobunyavirus	Virus Shamonda	ND	ND	ND	Négatif

Alphavirus	Chikungunya virus Chik # 4	2006	La Réunion, France	Humain	Négatif
Réovirus	Virus de la fièvre catarrhale du mouton, sérotype 2	2002	Corse, France	bovin	Négatif
Morbillivirus	Peste des petits ruminants souche PPRV 75/1	1975	Nigeria	chèvre	Négatif
N / A	Échantillons de sérum	2017	France métropolitaine	chèvre / bovin	Négatif
N / A	Échantillons de sérum	2015	Union des Comores	chèvre / bovin	Négatif
N / A	Échantillons de sérum	2016	Réunion, France	bovin	Négatif
N / A	Échantillons de sérum	2010	Tunisie	chèvre / chameau	Négatif
N / A	Échantillons de sérum	2011	Madagascar	chèvre / bovine	Négatif
N / A	Échantillons de sérum	2016	Mayotte	bovine	Négatif

NA / Non applicable, ND/Non déterminé

* testé pour déterminer Ase

4.4.2 Spécificité

- 5 Certains arbovirus appartenant au genre Phlebovirus mais aussi à d'autres genres viraux présentant des caractéristiques cliniques communes chez l'homme et / ou les ruminants tels que les alphavirus, flavivirus, orthobunyavirus, réovirus, morbillivirus (n = 10, **tableau 3B**) ont permis d'évaluer la spécificité analytique (DSpe Diagnostic Specificity), c'est-à-dire la proportion d'échantillons provenant d'animaux de référence non infectés détectés
- 10 comme négatifs dans le test. Des sérum avec un statut connu négatif pour la FVR, d'origines différentes provenant de zones indemnes de FVR (France métropolitaine, Tunisie,

Réunion) ou de zones connues comme à risque ou enzootiques (Mayotte, Union des Comores, Madagascar) (n = 150, **tableau 3B**) ont été testés.

La spécificité analytique a été évaluée sur 150 échantillons de sérum connus pour être 'négatifs' au virus de FVR mais collectés dans des pays situés en zone tropicale (Madagascar, Comores, Mayotte) où le virus FVR a circulé, afin d'identifier de possibles réactions croisées, ou dans d'autres territoires où l'introduction du virus de FVR est considérée comme à risque (Tunisie, France, Réunion).

Les résultats de spécificité analytique (Aspe, Analytical specificity) et de spécificité de diagnostic (DSpe, Diagnostic specificity) sont synthétisés dans le tableau 4 ci-dessous.

10

Tableau 4 : Rapprochement des résultats du test LFT de FVR et des résultats de realtime RT-PCR (Bird et al., 2007, Mwaengo et al., 2012)

		Résultats de la PCR		
		Positif	Négatif	Total
Résultats LFT	Positif	25	2	27
	Négatif	0	158	158
	Total	25	160	185

15

L'ensemble des souches de RVF testées ont été détectées positives par le TDR.

Seulement un échantillon sur 150 a été trouvé positif au virus FVR dans le test de diagnostic rapide selon l'invention, alors qu'il était négatif dans la ligne contrôle.

De plus, dix virus appartenant à des genres différents mais induisant des signes cliniques proches de ceux induits par le virus de la FVR, tels que avortements et hyperthermie ont été testés (**Tableau 3B**). Ils ont été détectés 'négatifs' pour la présence du virus FVR selon le test de l'invention, à l'exception du virus de la forêt de Gabek qui a donné une bande de très faible intensité. Le test présente donc une spécificité analytique de 98.75 % (n=160).

25

4.4.3 Détermination de la limite de détection du test

Six souches virales de virus FVR titrées de différentes origines (Ouganda, Mauritanie, Afrique du Sud) ont été choisies pour déterminer la limite de détection du test (**Tableau 5**).

Un volume de 150 µL de chaque suspension, en dilution sérielle de 10 en 10, additionné de 150 µL de tampon de migration a été testé. Le plus faible nombre de pfu (particules forming units ou 'particules formant des unités) détecté selon cet essai était de 3×10^3 pfu et 9×10^3 pfu, obtenus respectivement pour les souches Smithburn (Boshra et al., 2011) et Mauritania 26010-YK0 proche de la souche 25010-24 (El Mamy et al., 2014).

Tableau 5 : Limite de détection du LFT de la FVR à l'aide de six suspensions virales RVF titrées différentes.

Souche virale	Hôte	Localisation	Concentrations initiales de virus (pfu/ml)	Limite de détection du LFT (pfu)*
RVFV souche 56/74	vache	Afrique du Sud	1×10^7	1.5×10^5
RVFV souche 252/75	nd	Afrique du Sud	7×10^6	1.04×10^4
RVFV souche Ar 20368	moustique	Afrique du Sud	$1,5 \times 10^7$	2.2×10^5
RVFV souche AN 1830	mouton	Afrique du Sud	$1,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^4$
RVFV souche 26010-YK0	chameau	Mauritanie	6.3×10^6	9×10^3
RVFV souche Smithburn	moustique	Ouganda	2×10^6	3×10^3

10 pfu / ml: particules formant des unités par ml

* pfu déposé sur la bande

nd, non déterminé

Par conséquent, le niveau de spécificité et de sensibilité obtenu pour le test TDR (ou LFT) de l'invention est suffisamment élevé pour détecter le virus de la FVR dans des prélèvements de terrain permettant une première détection des premiers cas déclarés d'une épizootie. Une confirmation est cependant toujours recommandée par le laboratoire de référence national ou international permettant d'adapter au mieux la surveillance de la FVR en particulier dans le cadre d'un programme de contrôle de la RVF sur un territoire où la maladie est confirmée.

En conclusion, la FVR est l'une des maladies vectorielles virales majeures qui touche le monde entier particulièrement l'Afrique sub-saharienne et la péninsule arabique. La détection précoce de son infection tant dans le cheptel que chez l'Homme permet de limiter l'extension de la maladie. Le test de diagnostic rapide objet de l'invention, basé sur la nucléoprotéine N du virus FVR a été testé sur une grande diversité de souches virales. Il est le premier à être

développé et répond parfaitement à l'objectif fixé en ayant de très bonnes performances, notamment de très bons niveaux de sensibilité et de spécificité. De plus, aucun équipement ni réactif spécifique de laboratoire n'est nécessaire à sa bonne réalisation, ce qui lui donne tout son intérêt pour être utilisé dans les territoires difficiles d'accès en raisons des conditions politiques ou environnementales qui y règnent.

REFERENCES

- 10 Bird BH, Bawiec DA, Ksiazek TG, Shoemaker TR, Nichol ST. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Microbiol.* 2007 Nov;45(11):3506-13.
- Boshra H, Lorenzo G, Busquets N, Brun A. Rift valley fever: recent insights into pathogenesis and prevention. *J Virol.* 2011 Jul;85(13):6098-105. doi: 10.1128/JVI.02641-10.
- 15 Brüning A, Bellamy K, Talbot D, Anderson J. A rapid chromatographic strip test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus. *J Virol Methods.* 1999 Aug;81(1-2):143-54.
- Brustolin M, Talavera S, Nuñez A, Santamaria C, Rivas R, Pujol N, Valle M, Verdún M, Brun A, Pagès N, Busquets N. Rift Valley fever virus and European mosquitoes: vector competence of *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*). *Med Vet Entomol.* 2017 Dec;31(4):365-372
- 20 El-Akkad A. M. 1978. Rift Valley fever outbreak in Egypt. October—December 1977. *J. Egypt. Public Health Assoc.* 53: 123—128.
- El Mamy AB, Lo MM, Thiongane Y, Diop M, Isselmou K, Doumbia B, Baba MO, El Arbi AS, Lancelot R, Kane Y, Albina E, Cêtre-Sossah C. Comprehensive phylogenetic reconstructions of Rift Valley fever virus: the 2010 northern Mauritania outbreak in the *Camelus dromedarius* species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014 Dec;14(12):856-61. doi: 10.1089/vbz.2014.1605.
- 25 Faburay B, LaBeaud AD, McVey DS, Wilson WC, Richt JA. Current Status of Rift Valley Fever Vaccine Development. *Vaccines* (Basel). 2017 Sep 19;5(3). pii: E29. doi: 10.3390/vaccines5030029.
- 30 Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, Reid SM, King DP, Ebert K, Paton DJ, Kristersson T, Brocchi E, Grazioli S, Merza M. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J Virol Methods.* 2009 Jan;155(1):10-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.09.009.

Flick R, Bouloy M. Rift Valley fever virus. *Curr Mol Med*. 2005 Dec;5(8):827-34. Review.

Liu L, Celma CC, Roy P. Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins. *Virology*. 2008 Jul 18;5:82.

Mwaengo D, Lorenzo G, Iglesias J, Warigia M, Sang R, Bishop RP, Brun A. Detection
5 and identification of Rift Valley fever virus in mosquito vectors by quantitative real-time
PCR. *Virus Res*. 2012 Oct;169(1):137-43

REVENDEICATIONS

1. Dispositif de bandelette immunochromatographique, de préférence à écoulement latéral, pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un fragment antigénique de celle-ci, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins :
 - (i) Une membrane comprenant une zone de capture ou zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, et une zone de contrôle (C) sur laquelle est adsorbé un anticorps de contrôle,
 - (ii) Un papier filtre comprenant une zone sur laquelle est adsorbé un anticorps de révélation, spécifique de la nucléoprotéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation, ledit filtre étant superposé et fixé par adhésion à ladite membrane (i) de sorte à ce que les zones comprenant ledit anticorps de révélation, ledit anticorps de capture et ledit anticorps de contrôle soient distinctes |
 - (iii) et éventuellement un cadre en plastique protecteur, ou alternativement
 - (i') Une membrane comprenant successivement :
 - une première zone sur laquelle est adsorbée un anticorps de révélation, spécifique de la nucléoprotéine (N) ou d'un fragment antigénique de celle-ci, couplé à un système de révélation,
 - une zone de capture ou zone de test (T) sur laquelle est adsorbé un premier anticorps (anticorps de capture) spécifique de la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou d'un fragment antigénique de celle-ci et
 - une zone de contrôle (C) sur laquelle est adsorbé un anticorps de contrôle,
 - (ii') et éventuellement un cadre en plastique protecteur.
2. Dispositif de bandelette immunochromatographique selon la revendication 1, caractérisé en ce que la membrane est une membrane de nitrocellulose.

3. Dispositif de bandelette immunochromatographique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le système de révélation comprend des particules d'or colloïdal couplées à l'anticorps de révélation.
- 5 4. Dispositif de bandelette immunochromatographique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'anticorps de capture est un anticorps monoclonal, en particulier un anticorps désigné 10H3-4E4-3D5.
- 10 5. Dispositif de bandelette immunochromatographique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'anticorps de révélation est un anticorps monoclonal, en particulier un anticorps désigné 8E10-4A4.
- 15 6. Dispositif de bandelette immunochromatographique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est sous une forme lyophilisée et de préférence conditionnée dans un emballage stérile et étanche, en particulier un sachet en aluminium scellé.
- 20 7. Kit pour test de diagnostic rapide (TDR) destiné à la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) comprenant la nucléoprotéine (N) dudit virus ou un fragment antigénique de celui-ci, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :
 - a) Un dispositif de bandelette immunochromatographique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, et
 - b) Un tampon de migration de l'échantillon biologique dans le dispositif.
- 25 8. Procédé immunochromatographique ou test de diagnostic rapide (TDR) pour la détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un antigène spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou un fragment antigénique de celle-ci, mettant en œuvre un dispositif tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant les étapes de :
 - 30 (i) Mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la nucléoprotéine (N) du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) ou un fragment antigénique de celle-ci (antigène) avec un anticorps de capture spécifique de la nucléoprotéine (N) et un anticorps de

35 révélation spécifique de la nucléoprotéine (N), dans des conditions

permettant la formation d'un complexe anticorps de capture-antigène-anticorps de révélation, et

- (ii) Détection dudit complexe anticorps de capture-antigène-anticorps de révélation.

5

9. Procédé immunochromatographique selon la revendication 8, caractérisé en ce que :

10

- un volume de l'échantillon biologique mélangé au tampon de migration, de préférence volume à volume, est déposé sur la zone (S) réservée à l'échantillon, entraînant la réhydratation des anticorps de révélation et leur migration par capillarité le long de la membrane ;
- si l'antigène est présent dans l'échantillon testé, le complexe antigène -anticorps de révélation est capturé par l'anticorps de capture immobilisé sur la membrane au niveau de la zone de test (T) formant un complexe anticorps de révélation-antigène-antigène, visualisé sous la forme d'une ligne, de préférence rouge, au niveau de la zone de test (T), révélant un résultat positif ;

15

20

- le système de révélation, en particulier les particules d'or, en excès (ou non), a continué à migrer le long du dispositif jusqu'à être capturé par l'anticorps de contrôle immobilisé au niveau de la zone de contrôle (C) formant une ligne, de préférence rouge, au niveau de la zone de contrôle (C) validant le test.

25

10. Procédé immunochromatographique selon la revendication 8 ou 9, destiné à détecter le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) chez un animal infecté naturellement, et caractérisé en ce que l'échantillon biologique prélevé chez ledit animal est choisi dans le groupe constitué de sérum ou de plasma, en particulier provenant de prélèvements sanguins ou d'exsudats d'organes (foie, rate).

30

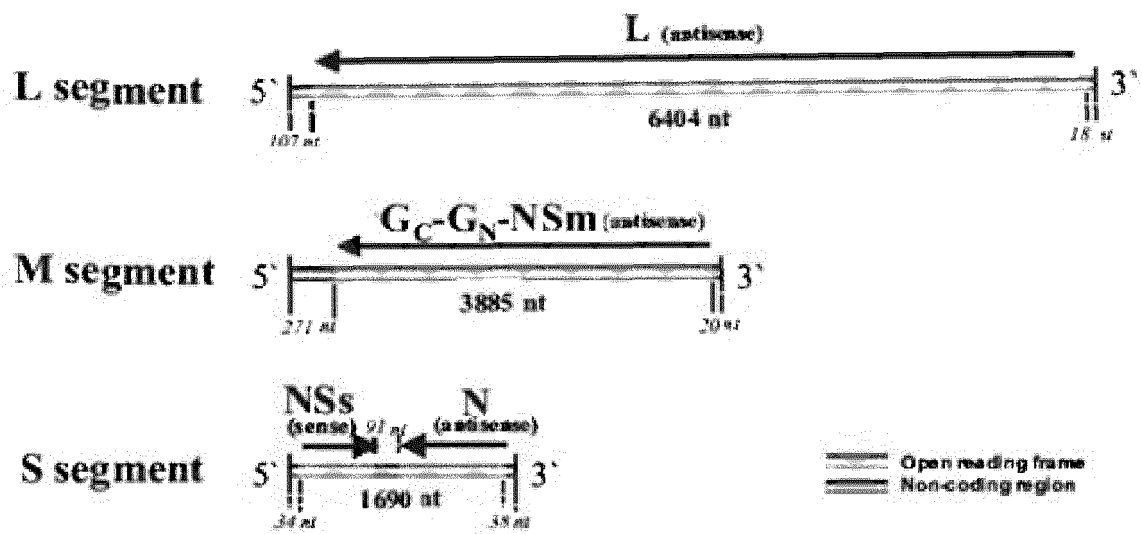
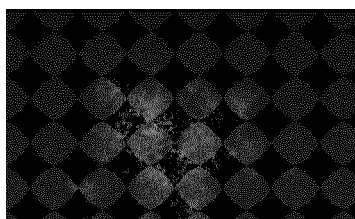
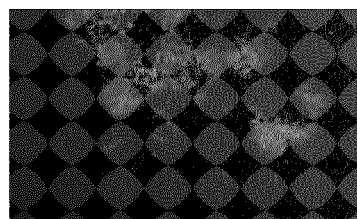


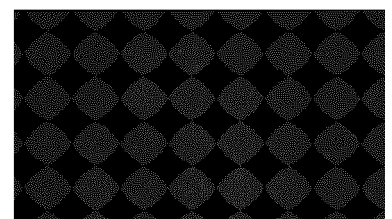
FIGURE 1



8 E10-4A4



10H3 -4E4-3D5



Negative control

FIGURE 2A

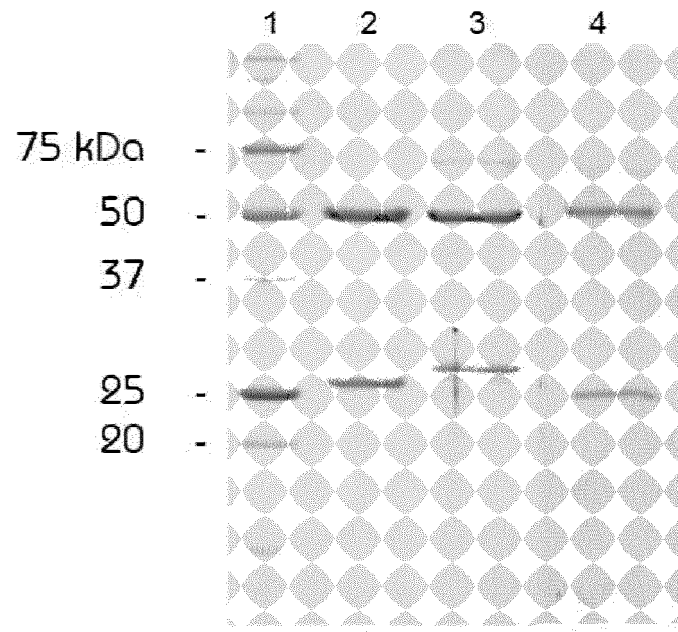


FIGURE 2B

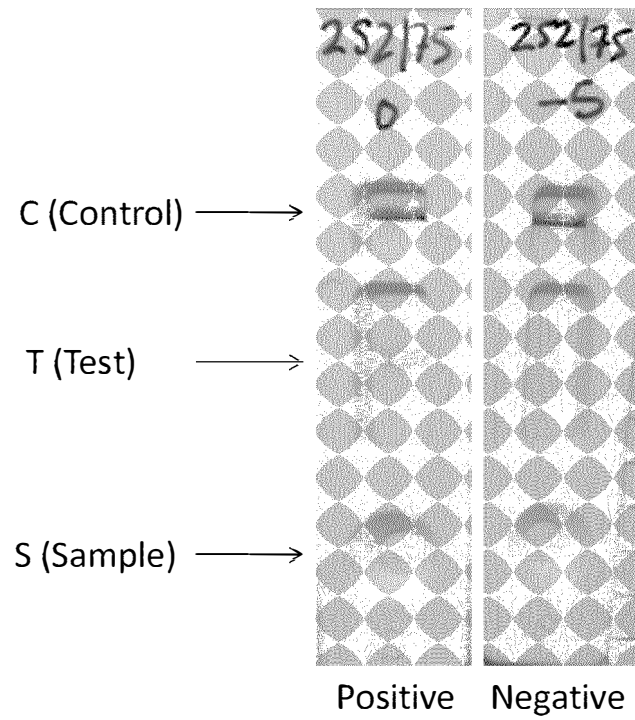


FIGURE 3

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D.

<120> Test de diagnostic rapide de la fièvre de la vallée du Rift (FVR)

<130> B250728D38451

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 735

<212> DNA

<213> Phlébivirus

$\langle 220 \rangle$

```
<221> misc_feature
```

<223> nucléoprotéine N, souche FVR ZH 548

$\langle 400 \rangle$ 1

atggacaact atcaagagct tgcgatccag tttgctgctc aagcagtgga ccgcaatgag 60

attgaacagt ggggtccgaga gtttgcttat caagggtttg atgcccgtag agttatcgaa 120

ctcttaaagc agtatggtgg ggctgactgg gagaaggatg ccaagaaaat gattgttctg 180

gctctaactc gtggcaacaa gcccaggagg atgatgatga aaatgtcgaa agaaggcaaa 240

gcaactgttg aggctctcat caacaagtat aagctaaagg aagggaatcc ttcccgggat 300

gagttgactc tatcacgagt tgctgccgcc ttggctggct ggacatgccg ggcttttggtc 360

gtcttgagtg agtggcttcc tgtcactggg actaccatgg acggcctatc ccctgcatac 420

ccgaggcata tgatgcaccc cagctttgct ggcatggtgg atccttctct accaggagac 480

tatctaaggg caatattaga tgctcactct ctgtatctgc tgcagttctc ccgggtcatc 540

aacccaaacc tccgaggtag aacaaaagag gaggttgctg caacgttcac gcaqccaatg 600

aatqcagcag tgaataqcaa ctttataagc catgagaaga qqagaqaatt cttgaaagcc 660

tttggacttg tggattccaa tgggaagccg tcagctgctg tcatggcagc cgctcaggct 720

tacaaqacag caqcc 735

 $\langle 210 \rangle \quad 2$

<211> 245

<212> PRT

<213> Phlébivirus

$\langle 220 \rangle$

<221> SITE

<222> (1) .. (245)

<223> nucléoprotéine N, souche FVR ZH 548

<400> 2

Met Asp Asn Tyr Gln Glu Leu Ala Ile Gln Phe Ala Ala Gln Ala Val
1 5 10 15

Asp Arg Asn Glu Ile Glu Gln Trp Val Arg Glu Phe Ala Tyr Gln Gly
20 25 30

Phe Asp Ala Arg Arg Val Ile Glu Leu Leu Lys Gln Tyr Gly Gly Ala
 35 40 45
 Asp Trp Glu Lys Asp Ala Lys Lys Met Ile Val Leu Ala Leu Thr Arg
 50 55 60
 Gly Asn Lys Pro Arg Arg Met Met Met Lys Met Ser Lys Glu Gly Lys
 65 70 75 80
 Ala Thr Val Glu Ala Leu Ile Asn Lys Tyr Lys Leu Lys Glu Gly Asn
 85 90 95
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Leu Ser Arg Val Ala Ala Ala Leu Ala
 100 105 110
 Gly Trp Thr Cys Gln Ala Leu Val Val Leu Ser Glu Trp Leu Pro Val
 115 120 125
 Thr Gly Thr Thr Met Asp Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Pro Arg His Met
 130 135 140
 Met His Pro Ser Phe Ala Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Pro Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Leu Arg Ala Ile Leu Asp Ala His Ser Leu Tyr Leu Leu Gln Phe
 165 170 175
 Ser Arg Val Ile Asn Pro Asn Leu Arg Gly Arg Thr Lys Glu Glu Val
 180 185 190
 Ala Ala Thr Phe Thr Gln Pro Met Asn Ala Ala Val Asn Ser Asn Phe
 195 200 205
 Ile Ser His Glu Lys Arg Arg Glu Phe Leu Lys Ala Phe Gly Leu Val
 210 215 220
 Asp Ser Asn Gly Lys Pro Ser Ala Ala Val Met Ala Ala Ala Gln Ala
 225 230 235 240
 Tyr Lys Thr Ala Ala
 245

<210> 3
 <211> 3885
 <212> DNA
 <213> Phlébovirus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> glycoprotéines Gn et GC (segment M), souche FVR ZH 548

<400> 3
 acacaaagac ggtgcattaa atgtatgttt tattaacaat tctaattctcg gttctggtgt 60
 gtgaagcggg tattagagtg tctctaagct ccacaagaga agagacctgc tttggtgact 120

ccactaacc	agagatgatt	gaaggagctt	gggattcact	cagagaggag	gagatgccgg	180
aggagctctc	ctgttctata	tcaggcataa	gagagggttaa	gacctcaagc	caggagttat	240
acagggcatt	aaaagccatc	attgctgctg	atggcttgaa	caacatcacc	tgccatggta	300
aggatcctga	ggacaagatt	tccctcataa	agggtcctcc	tcacaaaaag	cgggtgggga	360
tagttcggtg	tgagagacga	agagatgcta	agcaaatagg	gagagaaacc	atggcagggg	420
ttgcaatgac	agtccttcca	gccttagcag	tttttgcttt	ggcacctgtt	gttttgctg	480
aagaccccca	tctcagaaac	agaccaggga	aggggcacaa	ctacattgac	gggatgactc	540
aggaggatgc	cacatgcaaa	cctgtgacat	atgctggggc	atgtagcagt	tttgatgtct	600
tgcttgaaaa	gggaaaattt	ccccctttcc	agtcgtatgc	tcatcataga	actctactag	660
aggcagttca	cgacaccatc	attgcaaagg	ctgatccacc	tagctgtgac	cttctgagt	720
ctcatgggaa	cccctgcatg	aaagagaaac	tcgtgatgaa	gacacactgt	ccaaatgact	780
accagtcagc	tcattacctc	aacaatgacg	ggaaaatggc	ttcagtcaag	tgccctccta	840
agtatgagct	cactgaggac	tgcaactttt	gtaggcagat	gacaggtgct	agcctgaaga	900
aggggtctta	tcctctccaa	gacttgtttt	gtcagtcaag	tgaggatgat	ggatcaaaat	960
taaaaacaaa	aatgaaaggg	gtctgcgaag	tgggggttca	agcactcaaa	aagtgtgatg	1020
gccaactcag	cactgcacat	gaggttgtgc	cctttgcagt	gtttaagaac	tcaaagaagg	1080
tttatcttga	taagcttgac	cttaagactg	aggagaatct	gctaccagac	tcatttgtct	1140
gtttcgagca	taaggagacg	tacaaaggaa	caatggactc	tggtcagact	aagagggagc	1200
tcaaaagctt	tgatatctct	cagtgcccca	agattggagg	acatggtagt	aagaagtgca	1260
ctggggacgc	agcattttgc	tctgcttatg	agtgcactgc	tcagtacgcc	aatgcctatt	1320
gttcacatgc	taatgggtca	gggattgtgc	agatacaagt	atcaggggtc	tggaagaagc	1380
ctttatgtgt	agggtatgag	agagtggttg	tgaagagaga	actctctgcc	aagcccatcc	1440
agagagttga	gccttgacac	acttggtataa	ccaaatgtga	gcctcatgga	ttggttgtcc	1500
gatcaacagg	gttcaagata	tcatcagcag	ttgcttgtgc	tagcggagtt	tgcgctcacag	1560
gatcgcagag	tccttccacc	gagattacac	tcaagtatcc	agggatatcc	cagtcttctg	1620
ggggggacat	aggggttcac	atggcacacg	atgatcagtc	agttagctcc	aaaatagtag	1680
ctcactgccc	tccccaggac	ccgtgcttag	tgcatgactg	catagtgtgt	gctcatggcc	1740
tgataaatta	ccagtgtcac	actgctctca	gtgcctttgt	tgttgtgttt	gtattcagtt	1800
ctattgcaat	aatttgttta	gctattcttt	atagggtgct	taagtgcctg	aagattgccc	1860
caaggaaagt	tctgaatcca	ctaagtgtga	tcacagcctt	catcagatgg	atatataaga	1920
agatgggtgc	cagagtggca	gacaacatta	atcaagtga	cagggaaata	ggatggatgg	1980
aaggaggtca	gttggttcta	gggaaccctg	cccctattcc	tcgtcatgcc	ccaatcccac	2040
gttatagcac	atacctgatg	ttattattga	ttgtctcata	tgcatcagca	tgttcagaac	2100
tgattcaggc	aagctccaga	atcaccactt	gctctacaga	gggtgttaac	accaagtgtg	2160
gactgtctgg	cacagcattg	atcagagcag	ggtcagttgg	ggcagaggct	tgtttgatgt	2220

tgaagggggt	caaggaagat	caaaccaagt	tcttaaagat	aaaaactgtc	tcaagtgagc	2280
tatcatgcag	ggagggccag	agttattgga	ctgggtcctt	tagccctaaa	tgtttgagct	2340
caaggagatg	ccaccttgtc	ggggaatgcc	atgtgaatag	gtgtctgtct	tggagggaca	2400
atgaaacttc	agcagagttt	tcatttgttg	gggaaagcac	gaccatgcga	gagaataagt	2460
gttttgagca	atgtggagga	tgggggtgtg	ggtgtttcaa	tgtgaacca	tcttgcttat	2520
ttgtgcacac	gtatctgcag	tcagttagaa	aagaggccct	tagagttttt	aactgtatcg	2580
actgggtgca	taaactcact	ctagagatca	cagactttga	tggctctgtt	tcaacaatag	2640
acttgggagc	atcatctagc	cgtttcacaa	actggggttc	agttagcctc	tcactggacg	2700
cagagggcat	ttcaggctca	aatagctttt	ctttcattga	gagcccaggc	aaaggggatg	2760
caattgttga	tgagccattc	tcagaaattc	ctcggcaagg	gttcttgggg	gagatcaggt	2820
gcaattcaga	gtcctcagtc	ctgagtgtc	atgaatcatg	ccttagggca	ccaaacctta	2880
tctcatacaa	gcccatagata	gatcaattgg	agtgcacaac	aaatctgatt	gatccctttg	2940
ttgtctttga	gaggggttct	ctgccacaga	caaggaatga	caaaaccttt	gcagcttcaa	3000
aaggaaatag	aggtgttcaa	gctttctcta	agggtctgt	acaagctgat	ctaactctga	3060
tgtttgacaa	ttttgaggtg	gactttgtgg	gagcagccgt	atcttgtgat	gccgccttct	3120
taaatttgac	aggttgctat	tcttgcaatg	cagggggccag	ggctctgcctg	tctatcacat	3180
ccacaggaac	tggatctctc	tctgcccaca	ataaggatgg	gtctctgcat	atagtccttc	3240
catcagagaa	tggaacaaaa	gaccagtgtc	agatactaca	cttcactgtg	cctgaagtag	3300
aggaggagtt	tatgtactct	tgtgatggag	atgagcggcc	tctgttggtg	aaggggaccc	3360
tgatagccat	tgatccattt	gatgataggc	gggaagcagg	gggggaatca	acagttgtga	3420
atccaaaatc	tggatcttgg	aatttctttg	actgggtttc	tggactcatg	agttggtttg	3480
gagggcctct	taaaactata	ctcctcattt	gcctgtatgt	tgcattatca	attgggctct	3540
ttttcctcct	tatatatctt	ggaagaacag	gcctctctaa	aatgtggctt	gctgccacta	3600
agaaggcctc	atagatcagt	acgtgtaaaa	gcaatatggt	gaaataagta	gacataagca	3660
aacctaat	tgtaagtatt	gtacagatag	gtcaaattat	tggaatatcc	aagcttagaa	3720
acttatgcaa	taatacttta	gatgtaagct	tagttgtaat	ttgggggtgg	gggggtgaggc	3780
agcagcagtc	tcaagtgcct	gtgaatatcc	tagttggcgt	aatcgtcttt	tgccagatta	3840
gctgggaatt	aaactaactc	tttgaagttg	caccggtctt	tgtgt		3885

<210> 4
 <211> 1197
 <212> PRT
 <213> Phlébovirus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(1197)
 <223> glycoprotéines Gn et GC (segment M), souche FVR ZH 548

<400> 4

Met Tyr Val Leu Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Leu Val Cys Glu Ala

1				5				10				15			
Val	Ile	Arg	Val 20	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr 25	Arg	Glu	Glu	Thr	Cys 30	Phe	Gly
Asp	Ser	Thr 35	Asn	Pro	Glu	Met	Ile 40	Glu	Gly	Ala	Trp	Asp 45	Ser	Leu	Arg
Glu	Glu 50	Glu	Met	Pro	Glu	Glu 55	Leu	Ser	Cys	Ser	Ile 60	Ser	Gly	Ile	Arg
Glu 65	Val	Lys	Thr	Ser	Ser 70	Gln	Glu	Leu	Tyr	Arg 75	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile 80
Ile	Ala	Ala	Asp	Gly 85	Leu	Asn	Asn	Ile	Thr 90	Cys	His	Gly	Lys	Asp 95	Pro
Glu	Asp	Lys	Ile 100	Ser	Leu	Ile	Lys	Gly 105	Pro	Pro	His	Lys	Lys 110	Arg	Val
Gly	Ile	Val 115	Arg	Cys	Glu	Arg	Arg 120	Arg	Asp	Ala	Lys	Gln 125	Ile	Gly	Arg
Glu	Thr 130	Met	Ala	Gly	Ile	Ala 135	Met	Thr	Val	Leu	Pro 140	Ala	Leu	Ala	Val
Phe 145	Ala	Leu	Ala	Pro	Val 150	Val	Phe	Ala	Glu	Asp 155	Pro	His	Leu	Arg	Asn 160
Arg	Pro	Gly	Lys	Gly 165	His	Asn	Tyr	Ile	Asp 170	Gly	Met	Thr	Gln	Glu 175	Asp
Ala	Thr	Cys	Lys 180	Pro	Val	Thr	Tyr	Ala 185	Gly	Ala	Cys	Ser	Ser 190	Phe	Asp
Val	Leu	Leu 195	Glu	Lys	Gly	Lys	Phe 200	Pro	Leu	Phe	Gln	Ser 205	Tyr	Ala	His
His	Arg 210	Thr	Leu	Leu	Glu	Ala 215	Val	His	Asp	Thr	Ile 220	Ile	Ala	Lys	Ala
Asp 225	Pro	Pro	Ser	Cys	Asp 230	Leu	Leu	Ser	Ala	His 235	Gly	Asn	Pro	Cys	Met 240
Lys	Glu	Lys	Leu	Val 245	Met	Lys	Thr	His	Cys 250	Pro	Asn	Asp	Tyr	Gln 255	Ser
Ala	His	Tyr	Leu 260	Asn	Asn	Asp	Gly	Lys 265	Met	Ala	Ser	Val	Lys 270	Cys	Pro
Pro	Lys	Tyr 275	Glu	Leu	Thr	Glu	Asp 280	Cys	Asn	Phe	Cys	Arg 285	Gln	Met	Thr

Gly Ala Ser Leu Lys Lys Gly Ser Tyr Pro Leu Gln Asp Leu Phe Cys
 290 295 300

Gln Ser Ser Glu Asp Asp Gly Ser Lys Leu Lys Thr Lys Met Lys Gly
 305 310 315 320

Val Cys Glu Val Gly Val Gln Ala Leu Lys Lys Cys Asp Gly Gln Leu
 325 330 335

Ser Thr Ala His Glu Val Val Pro Phe Ala Val Phe Lys Asn Ser Lys
 340 345 350

Lys Val Tyr Leu Asp Lys Leu Asp Leu Lys Thr Glu Glu Asn Leu Leu
 355 360 365

Pro Asp Ser Phe Val Cys Phe Glu His Lys Gly Gln Tyr Lys Gly Thr
 370 375 380

Met Asp Ser Gly Gln Thr Lys Arg Glu Leu Lys Ser Phe Asp Ile Ser
 385 390 395 400

Gln Cys Pro Lys Ile Gly Gly His Gly Ser Lys Lys Cys Thr Gly Asp
 405 410 415

Ala Ala Phe Cys Ser Ala Tyr Glu Cys Thr Ala Gln Tyr Ala Asn Ala
 420 425 430

Tyr Cys Ser His Ala Asn Gly Ser Gly Ile Val Gln Ile Gln Val Ser
 435 440 445

Gly Val Trp Lys Lys Pro Leu Cys Val Gly Tyr Glu Arg Val Val Val
 450 455 460

Lys Arg Glu Leu Ser Ala Lys Pro Ile Gln Arg Val Glu Pro Cys Thr
 465 470 475 480

Thr Cys Ile Thr Lys Cys Glu Pro His Gly Leu Val Val Arg Ser Thr
 485 490 495

Gly Phe Lys Ile Ser Ser Ala Val Ala Cys Ala Ser Gly Val Cys Val
 500 505 510

Thr Gly Ser Gln Ser Pro Ser Thr Glu Ile Thr Leu Lys Tyr Pro Gly
 515 520 525

Ile Ser Gln Ser Ser Gly Gly Asp Ile Gly Val His Met Ala His Asp
 530 535 540

Asp Gln Ser Val Ser Ser Lys Ile Val Ala His Cys Pro Pro Gln Asp
 545 550 555 560

Pro Cys Leu Val His Asp Cys Ile Val Cys Ala His Gly Leu Ile Asn
 565 570 575

Tyr Gln Cys His Thr Ala Leu Ser Ala Phe Val Val Val Phe Val Phe
 580 585 590
 Ser Ser Ile Ala Ile Ile Cys Leu Ala Ile Leu Tyr Arg Val Leu Lys
 595 600 605
 Cys Leu Lys Ile Ala Pro Arg Lys Val Leu Asn Pro Leu Met Trp Ile
 610 615 620
 Thr Ala Phe Ile Arg Trp Ile Tyr Lys Lys Met Val Ala Arg Val Ala
 625 630 635 640
 Asp Asn Ile Asn Gln Val Asn Arg Glu Ile Gly Trp Met Glu Gly Gly
 645 650 655
 Gln Leu Val Leu Gly Asn Pro Ala Pro Ile Pro Arg His Ala Pro Ile
 660 665 670
 Pro Arg Tyr Ser Thr Tyr Leu Met Leu Leu Leu Ile Val Ser Tyr Ala
 675 680 685
 Ser Ala Cys Ser Glu Leu Ile Gln Ala Ser Ser Arg Ile Thr Thr Cys
 690 695 700
 Ser Thr Glu Gly Val Asn Thr Lys Cys Arg Leu Ser Gly Thr Ala Leu
 705 710 715 720
 Ile Arg Ala Gly Ser Val Gly Ala Glu Ala Cys Leu Met Leu Lys Gly
 725 730 735
 Val Lys Glu Asp Gln Thr Lys Phe Leu Lys Ile Lys Thr Val Ser Ser
 740 745 750
 Glu Leu Ser Cys Arg Glu Gly Gln Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Phe Ser
 755 760 765
 Pro Lys Cys Leu Ser Ser Arg Arg Cys His Leu Val Gly Glu Cys His
 770 775 780
 Val Asn Arg Cys Leu Ser Trp Arg Asp Asn Glu Thr Ser Ala Glu Phe
 785 790 795 800
 Ser Phe Val Gly Glu Ser Thr Thr Met Arg Glu Asn Lys Cys Phe Glu
 805 810 815
 Gln Cys Gly Gly Trp Gly Cys Gly Cys Phe Asn Val Asn Pro Ser Cys
 820 825 830
 Leu Phe Val His Thr Tyr Leu Gln Ser Val Arg Lys Glu Ala Leu Arg
 835 840 845
 Val Phe Asn Cys Ile Asp Trp Val His Lys Leu Thr Leu Glu Ile Thr
 850 855 860

Asp Phe Asp Gly Ser Val Ser Thr Ile Asp Leu Gly Ala Ser Ser Ser
 865 870 875 880

Arg Phe Thr Asn Trp Gly Ser Val Ser Leu Ser Leu Asp Ala Glu Gly
 885 890 895

Ile Ser Gly Ser Asn Ser Phe Ser Phe Ile Glu Ser Pro Gly Lys Gly
 900 905 910

Tyr Ala Ile Val Asp Glu Pro Phe Ser Glu Ile Pro Arg Gln Gly Phe
 915 920 925

Leu Gly Glu Ile Arg Cys Asn Ser Glu Ser Ser Val Leu Ser Ala His
 930 935 940

Glu Ser Cys Leu Arg Ala Pro Asn Leu Ile Ser Tyr Lys Pro Met Ile
 945 950 955 960

Asp Gln Leu Glu Cys Thr Thr Asn Leu Ile Asp Pro Phe Val Val Phe
 965 970 975

Glu Arg Gly Ser Leu Pro Gln Thr Arg Asn Asp Lys Thr Phe Ala Ala
 980 985 990

Ser Lys Gly Asn Arg Gly Val Gln Ala Phe Ser Lys Gly Ser Val Gln
 995 1000 1005

Ala Asp Leu Thr Leu Met Phe Asp Asn Phe Glu Val Asp Phe Val
 1010 1015 1020

Gly Ala Ala Val Ser Cys Asp Ala Ala Phe Leu Asn Leu Thr Gly
 1025 1030 1035

Cys Tyr Ser Cys Asn Ala Gly Ala Arg Val Cys Leu Ser Ile Thr
 1040 1045 1050

Ser Thr Gly Thr Gly Ser Leu Ser Ala His Asn Lys Asp Gly Ser
 1055 1060 1065

Leu His Ile Val Leu Pro Ser Glu Asn Gly Thr Lys Asp Gln Cys
 1070 1075 1080

Gln Ile Leu His Phe Thr Val Pro Glu Val Glu Glu Glu Phe Met
 1085 1090 1095

Tyr Ser Cys Asp Gly Asp Glu Arg Pro Leu Leu Val Lys Gly Thr
 1100 1105 1110

Leu Ile Ala Ile Asp Pro Phe Asp Asp Arg Arg Glu Ala Gly Gly
 1115 1120 1125

Glu Ser Thr Val Val Asn Pro Lys Ser Gly Ser Trp Asn Phe Phe

1130						1135						1140					
Asp	Trp	Phe	Ser	Gly	Leu	Met	Ser	Trp	Phe	Gly	Gly	Pro	Leu	Lys			
	1145					1150					1155						
Thr	Ile	Leu	Leu	Ile	Cys	Leu	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser	Ile	Gly	Leu			
	1160					1165					1170						
Phe	Phe	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Arg	Thr	Gly	Leu	Ser	Lys	Met			
	1175					1180					1185						
Trp	Leu	Ala	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	Ser									
	1190					1195											

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 860694
FR 1856506

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
Y	<p>M. TURELL ET AL: "Wicking Assay for the Rapid Detection of Rift Valley Fever Viral Antigens in Mosquitoes (Diptera: Culicidae)", JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY., vol. 48, no. 3, 1 mai 2011 (2011-05-01), pages 628-633, XP055586577, US ISSN: 0022-2585, DOI: 10.1603/ME10219 * abrégé *</p> <p>* page 629, alinéa "Dipstick antigen assay"; page 632, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, premier alinéa;; figure 1 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10	G01N33/558 G01N33/577
Y	<p>J. M. FAFETINE ET AL: "Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Rift Valley Fever Virus Nucleoprotein", VETERINARY MEDICINE, vol. 60, 8 novembre 2013 (2013-11-08), pages 24-30, XP055268678, ISSN: 1865-1674, DOI: 10.1111/tbed.12140 * abrégé *</p> <p>* page 25, colonne de gauche, 3ème alinéa; page 25, colonne de droite, premier alinéa; page 28, colonne de droite, premier alinéa *</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-10	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</div> <p style="text-align: center;">G01N</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 mai 2019		Adida, Anne	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul</p> <p>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</p> <p>A : arrière-plan technologique</p> <p>O : divulgation non-écrite</p> <p>P : document intercalaire</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention</p> <p>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.</p> <p>D : cité dans la demande</p> <p>L : cité pour d'autres raisons</p> <p>.....</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p> </div> </div>			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 860694
FR 1856506

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>SHUETSU FUKUSHI ET AL: "Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 180, no. 1, 22 décembre 2011 (2011-12-22), pages 68-74, XP028457877, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2011.12.013 [extrait le 2012-01-05] * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p>
A	<p>MARTIN-FOLGAR RAQUEL ET AL: "Development and characterization of monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus nucleocapsid protein generated by DNA immunization", 20100501, vol. 2, no. 3, 1 mai 2010 (2010-05-01), pages 275-284, XP009189743, ISSN: 1942-0862 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10	
A	<p>DATABASE WPI Week 201806 Thomson Scientific, London, GB; AN 2017-87911P XP002791079, -& CN 107 478 838 A (GUIZHOU PROVINCIAL PEOPLES HOSPITAL) 15 décembre 2017 (2017-12-15) * abrégé * & CN 107 478 838 A (GUIZHOU PEOPLES HOSPITAL) 15 décembre 2017 (2017-12-15) * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-10	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 mai 2019		Adida, Anne	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> </div> </div>			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 860694
FR 1856506

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>WILSON W C ET AL: "Diagnostic Approaches for Rift Valley Fever", DEVELOPMENTS IN BIOLOGI, KARGER, BASEL, CH, vol. 135, 19 septembre 2012 (2012-09-19), pages 73-78, XP008180811, ISSN: 1424-6074, DOI: 10.1159/000276828</p> <p>* le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-10	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 mai 2019		Adida, Anne	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1856506 FA 860694

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09-05-2019

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 107478838	A	15-12-2017	AUCUN
